杏鮑菇褐斑病菌之半選擇性培養基

陳錦桐[1]　黃振文[2,3]

1 台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植物病理組
2 台中市國光路 國立中興大學植物病理學系
3 聯絡作者：電子郵件 jwhuang@dragon.nchu.edu.tw，傳真：+886-4-22851676
接受日期：中華民國 93 年 4 月30 日

摘　要

陳錦桐、黃振文. 2004. 杏鮑菇褐斑病菌之半選擇性培養基 植病會刊 13: 107-116.

評估十二種不同的碳素源與十二種氮素源對杏鮑菇褐斑病菌（*Gliocladium roseum* Bainier）菌絲生長的影響，結果發現麥芽糖、可溶性澱粉、蔗糖及己六醇等碳素源和硝酸鹽與亞硝酸鹽之氮素源，均有助於本菌菌絲的生長，其中以麥芽糖搭配亞硝酸鈉效果最好。利用含有麥芽糖和亞硝酸鈉的蔡氏修正培養基，評估不同化學藥劑對本菌生長的影響，證實腐絕 5 ppm、福多寧400 ppm、鏈黴素 500 ppm，青黴素 500 ppm 及氯黴素 500 ppm 等不具有抑制本菌菌絲生長之功效。將麥芽糖 30公克、亞硝酸鈉2 公克、磷酸氫二鉀1 公克、硫酸鎂0.5 公克、氯化鉀0.5 公克、硫酸鐵0.01 公克、洋菜粉 15 公克及蒸餾水 1 公升均勻混合，高溫高壓滅菌後，逐一添加福多寧 200 ppm、腐絕 4 ppm、鏈黴素 200 ppm、青黴素200 ppm 及氯黴素 200 ppm等藥劑，製成MNa（Maltose-$NaNO_2$）半選擇性培養基，可以有效偵測木屑中存活的杏鮑菇褐斑病菌。利用 MNa 半選擇性培養基，檢測本菌的感染源，結果在山黃麻木屑與菇舍栽培場鄰近的樹林土壤中，發現有本病原菌的存在，尤其在菇舍空氣濾網上，有大量的褐斑病菌附著污染。

關鍵詞：杏鮑菇，褐斑病菌，麥芽糖—亞硝酸鈉半選擇性培養基

緒　言

Gliocladium roseum Bainier 是杏鮑菇的病原菌，它對於其他多種菇類亦均具有病原性[1]，是食用菇類重要病原菌之一。本菌也會引起馬鈴薯乾腐病[14]、香蕉冠腐病[10]以及釋迦果腐病[13]。*Gliocladium* Corda 屬是一種土媒眞菌，生長在腐敗的植物體上，廣泛分布在世界各地[5]，具有極強的腐生能力，可存活在扁蝨或死亡的蟲體[4]及不同的眞菌與黏菌上[12]；它也可棲居在混雜的落葉樹林中，如在山毛櫸及木麻黃等林地[6,9]，並且會侵害三葉草[8]、豌豆、苜蓿[3]及大豆[7]等生長勢較弱的植體。往昔，Park 等氏[11]曾研發 *G. roseum* 與 *G. virens* 之選擇性培養基，藉以探討兩菌類的生態習性。然而由於製作該兩菌之選擇性培養基的過程，需要添加 啶黃素（Acriflavine）與五氯硝苯（Pentachloronitrobenzene, PCNB）兩種藥劑，且它們迄今皆已成爲禁藥，取得不易。因此，本研究的主要目的在於嘗試以蔡氏培養基（Czapek's medium）爲基礎，研製 *G. roseum* 的半選擇性培養基，祈有助於探討 *G. roseum* 的生態與防治方法。

材料與方法

供試菌株來源

杏鮑菇 [*Pleurotus eryngii*（Dc. : Fr.）Quel.] 褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 兩菌株，係採自台中縣霧峰鄉行政院農委會農試所菇類栽培場[1]。兩菌株分別單孢培養於 24℃ 馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基（potato dextrose agar, PDA）平板上，作爲本研究的供試菌株。

碳素源對病原菌生長的影響

以 0.2 %（w/v）硝酸鈉（$NaNO_3$）作爲Czapek's 培養基[2]的氮素源後分別添加 3 %（w/v）蔗糖、葡萄糖、果糖、甘露糖（Mannose）、半乳糖（Galactose）、己六醇（Sorbitol）、木糖（Xylose）、棉子糖（Raffinose）、澱粉、麥芽糖（Maltose）、甘露醇糖（Mannitol）及甘油（Glycerol）等 12 種作爲碳素源，經高溫高壓（121℃，15 1b/cm^2、15 min）滅菌後製成培養基平板，隨即以三號打孔器（內徑 0.7 公分）切取水瓊脂（water agar, WA）平板

培養 14 天的杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株之菌落邊緣菌絲塊，分別移植至前述不同碳素源培養基平板中央，於生長箱 28℃，培養 7 天後，量取菌落大小，每一處理各有四重複。本試驗重複進行二次。

不同碳、氮素源組合對病原菌生長的影響

以 3 %（w/v）麥芽糖、己六醇及可溶性澱粉，分別替代 Czapek's 培養基之碳素源，並以蔗糖作對照組，然後分別加入 0.2 %（w/v）硝酸鉀、天門冬醯氨酸（Asparagine）、酪蛋白（Casein）、酪氨酸（Tyrosine）、硝酸鈉、亞硝酸鈉、硝酸銨、氯化銨、硫酸銨、磷酸銨[（NH_4）$_2$ HPO_4]、硝酸鈣 [Ca（NO_3）$_2$ $4H_2O$]及尿素（NH_2CONH_2）等 12 種作爲氮素源，共計有 48 種組合，經高溫高壓滅菌後製成培養基平板，隨即以三號打孔器切取在 WA 平板培養 14 天的杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株之菌落邊緣菌絲塊，分別移植至前述各種不同碳氮素源組合的培養基平板中央，於生長箱 28 ℃，培養 7 天後，量取菌落大小，每一處理各有四重複，且重複試驗二次。

化學藥劑對病原菌菌絲生長的影響

修正Czapek's 培養基，以 3 %（w/v）麥芽糖作爲碳素源，0.2 %（w/v）亞硝酸鈉作爲氮素源，製成麥芽糖-亞硝酸鈉培養基，高溫高壓滅菌後，待溫度降至 50℃時，隨即分別加入 250、500 ppm 免賴得（Benomyl），500、1000 ppm 貝芬替（Carbendazim），1000、2,000 ppm 四氯異苯晴（Daconil），200、400 ppm 福多寧（Flutolanil），1000、2000 ppm 腐絕（Mertect），200、400 ppm 撲克拉錳（Prochloraz-Mn）及 500、1000 ppm 依普同（Iprodione）等藥劑（表一），並以不加藥劑作爲對照組。隨後以三號打孔器切取 PDA 培養基平板培養 14 天之杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株之菌落邊緣菌絲塊，分別移植至上述含不同化學藥劑的培養基平板中央，在生長箱 28℃，培養 7 天後，評估不同化學藥劑對杏鮑菇褐斑病菌之菌絲生長的影響。

製作麥芽糖－亞硝酸鈉培養基，經高溫高壓滅菌後，待溫度降至 50℃ 時，隨即分別加入 0、1、2、3、4 及 5 ppm 之免賴得、腐絕或撲克拉錳三種藥劑。將杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 二菌株之孢子懸浮液（1.3×10^4 spores/ml），取 100 μl 均勻塗抹於含有不同化學藥劑濃度的培養基平板上，於生長箱 28℃，24 小時後，在顯微鏡下量取兩菌株各 25 個孢子發芽後的菌絲長度。修正 Czapek's 培養基，以 0.2 %（w/v）亞硝酸鈉作爲氮素源，3 %（w/v）麥芽糖作爲碳素源，高溫高壓滅菌後，分別加入 0、100、200、300、400 及 500 ppm 的氯黴素（Chloramphenicol, Sigma）、青黴素（Penicillin G, Sigma）或鏈黴素（Streptomycin sulfate, Sigma）後，製成培養基平板，然後在上述培養基上，分別塗抹GR-12 與GR-28 兩菌株之孢子懸浮液（10^4 spres/ml）0.2 毫升後，在 28℃培養 24 小時，即移置於顯微鏡下逢機量取兩菌株各 25 個孢子發芽後的菌絲長度，上述三種試驗，每一處理有四重複，且均連續重複進行二次試驗。

不同培養基偵測病原菌的效率與其他雜菌之污染率

以 0.2 %（w/v）$NaNO_2$ 與 3 %（w/v）麥芽糖分別取代 Czapek's 培養基的氮碳素源，高溫高壓滅菌後，逐一加入 200 ppm 福多寧、4 ppm 腐絕、200 ppm 鏈黴素、200 ppm 氯黴素及 200 ppm 青黴素製成麥芽糖—亞硝酸納半選擇性培養基（Maltose-$NaNO_2$, MNa）。參照 Park 等氏[11] 以 PDA 加入 50 ppm 鏈黴素及 50 ppm 氯黴素配製成 PDASA 培養基；另以每公升 3.0 克葡萄糖和 1.0 克硝酸鈉作爲 Czapek's 培養基之碳氮素源，再加入 1 ppm 免賴得、50 ppm Sodium propionate、50 ppm 鏈黴素、50 ppm 氯黴素及 1 %（w/v） 玫瑰紅（rose bengal）製成 BAM培養基。

表一、本研究所使用之農業藥劑普通名、中文名、化學名及製造廠商

Table 1. Common names, Chinese names, chemical names and manufacturers of pesticides tested in this study

Common name	Chinese name	Chemical name	Mnaufacturer
Benomyl	免賴得	50% WP, Methyl-1-1-(butylcarbamoyl) -2-benzimidazole carbamate	Du pont
Carbendazim	貝芬替	50% WP, 2-(methoxycarbonylamino) benzimidazole	BASF
Daconil	達克寧	75% WP, Tetrachloroisophthalonitrile	Ihara
Flutolanil	福多寧	50% WP, α, α, α-trifluoro-3'- isopropoxy-2-toluanilide	BASF
Iprodine	依普同	23.7% WP, 3-(3,5-Dichlorophenyl)-1-isopropyl -carbamoylhydantion	Rhone-Poulenc Merck Sharp＆Dome
Mertect	腐絕	40% WP, 2(4-thiazolyl)benzimidazole	
Prochloraz-Mn	撲克拉錳	50% WP, N-propyl-N-(2-(2,4,6-trichlorophenoxy)-ethyl)-imidazole-1-carboxamide)manganese	Schering

隨後取GR-12與GR-28菌株的孢子懸浮液（10^4 spores/ml）10毫升，分別拌入100公克的木屑中，陰乾後，逢機各取10公克的木屑，加入90毫升的無菌水，以震盪器（GENIE-2 Vortex, USA）150 rpm 振盪10分鐘，將木屑懸浮液以無菌水作系列稀釋後，取100倍稀釋液0.2毫升，滴加於MNa、PDA、PDASA及BAM等培養基平板中央，以玻棒均勻塗佈，置於28℃生長箱，不照光，5天後，記錄每一平板出現杏鮑菇褐斑病菌的菌落數，然後換算成每克木屑中實際的菌量數，再除以原先拌入木屑的菌量數，即求得各培養基由木屑中偵測本菌的回收率。每處理各有四重複；此外，亦一併調查各培養基平板出現其他眞菌與細菌等雜菌的數目。本試驗重複進行二次。

應用MNa半選擇性培養基檢測病原菌

自農試所菇舍栽培場鄰近之菜園土（土壤-A）、花圃土（土壤-B）、林木土（土壤-C）、洋菇稻草堆肥、泥碳土、米糠、粉頭及堆積場之木屑，逢機取5處樣品均勻混合陰乾後，各秤取10 g 加入90 ml 的無菌水均勻振盪；此外，又將栽培室之空氣過濾網，以敲打方式蒐集孢子與灰塵混雜物，秤取1 g 加入9 ml 的無菌水均勻振盪；取加濕器的水5 ml，加入95 ml 無菌水均勻振盪；各處理經過系列稀釋後，各取100倍稀釋液0.5 ml 滴於MNa半選擇性培養基平板中央，塗抹均勻，並以無菌水作爲對照，置於28℃下，每處理各有四重複，並重複試驗四次，5天後，由平板出現之菌落數推算每公克或毫升樣品中出現 *G. roseum* 的數量。此外，逢機取各樣品分離獲得的5個菌株，以杏鮑菇體檢測它們的病原性。另外將罹患褐斑病之杏鮑菇菇體，取出現或未出現病徵者，切成0.5×0.5公分大小的小片後，分別移置MNa半選擇性培養基平板上，在28℃，五天後觀察各切離組織有無褐斑病菌長出。

結　果

碳素源對病原菌生長的影響

在十二種不同的碳素源中，麥芽糖與蔗糖（對照組）有助於杏鮑菇褐斑病菌GR-28菌株的菌絲生長，而己六醇、麥芽糖及可溶性澱粉則較蔗糖更有助於褐斑病菌GR-12菌株的菌絲生長，而半乳糖則會顯著抑制二菌株的生長；至於其他糖類對二菌株間的生長則無顯著的促進效果（圖一），由此處可發現以麥芽糖、己六醇、可溶性澱粉及蔗糖爲碳素源，對二菌株的菌絲生長促進效果較佳。

不同碳、氮素源組合對病原菌生長的影響

以3％（w/v）蔗糖、己六醇、麥芽糖及可溶性澱粉分別替代Czapek's培養基之碳素源，然後分別加入十二種不同氮素源的組合中，發現硝酸鈉、亞硝酸鈉、硝酸鈣及硝酸鉀均有助於杏鮑菇褐斑病菌GR-12與GR-28菌株的菌絲生長，其中麥芽糖—亞硝酸鈉和己六醇—亞硝酸鈉之碳氮組合顯著較蔗糖－硝酸鈉組合有助於促進本菌的生長。至於氯化銨—蔗糖的組合較不利於二菌株的生長（表二）。試驗結果顯示，麥芽糖—亞硝酸鈉之碳氮組合最有利於杏鮑菇褐斑病菌GR-12與GR-28菌株的菌絲生長，因此，選擇該組合做爲研發本菌選擇性培養基的基礎碳氮素源。

化學藥劑對病原菌生長的影響

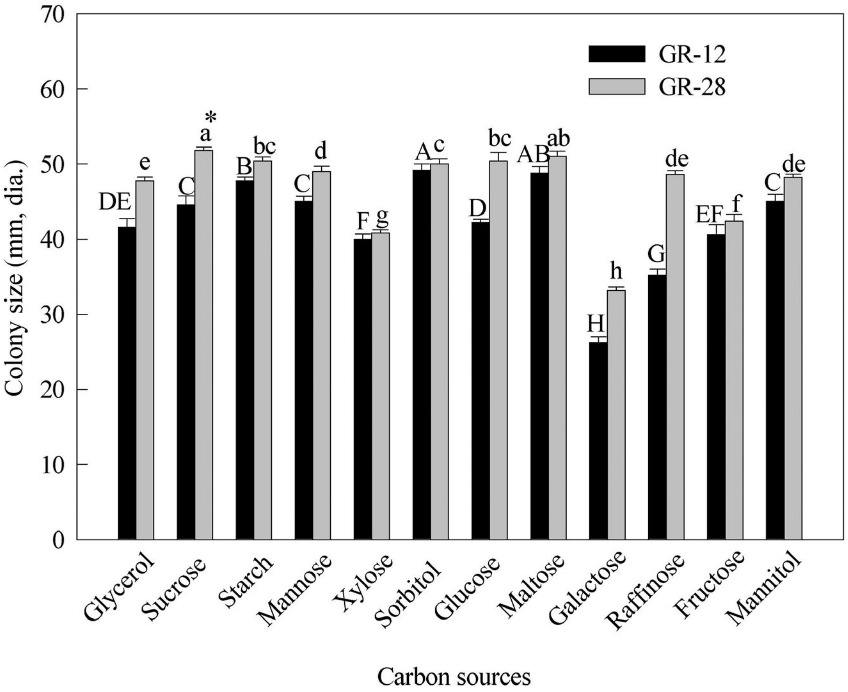
在麥芽糖－亞硝酸鈉培養基中添加不同化學藥劑，發現免賴得、貝芬替、四氯異苯晴、腐絕、福多寧、依普同及撲克拉錳七種化學藥劑皆會抑制杏鮑菇褐斑病菌GR-12與GR-28菌株的菌絲生長。其中福多寧對二菌株的抑制效果最差，尤其福多寧濃度在200-400 ppm時，均不會顯著抑制本菌的生長（表三）。進一步，在麥芽糖-亞硝酸鈉培養基中，發現5 ppm免賴得對於褐斑病菌菌絲之生長尚具有抑制作用，而撲克拉錳在1 ppm以上，即會顯著抑制其菌絲的生長，且隨其濃度提升而有增強抑菌的效果。然而腐絕在濃度1-5 ppm卻均無抑制本菌菌絲生長的效果（表四）。此外，在麥芽糖搭配亞硝酸鈉培養基中，分別加入100-500 ppm濃度的鏈黴素、青黴素及氯黴素等三種抗生素，結果顯示它們對於杏鮑菇褐斑病菌GR-12與GR-28菌株的菌絲生長，均不具抑制效果（表五）。

不同培養基偵測病原菌的效率與其他雜菌污染率

利用BAM、PDA、PDASA及MNa等四種不同培養基，分別測定每克木屑中含有褐斑病菌的菌量數，結果發現利用麥芽糖—亞硝酸鈉（MNa）半選擇性培養基檢測本菌之效果顯著優於其他三種培養基，尤其回收GR-28菌株的效果均達95％以上（圖二和圖三）。BAM培養基回收效果較差，僅20-40％；而PDA與PDASA培養基回收本菌的效果更低於20％。此外，MNa半選擇性培養基出現雜菌的比率，明顯較PDA與PDASA培養基遭受污染的比率低。

應用MNa半選擇性培養基檢測病原菌

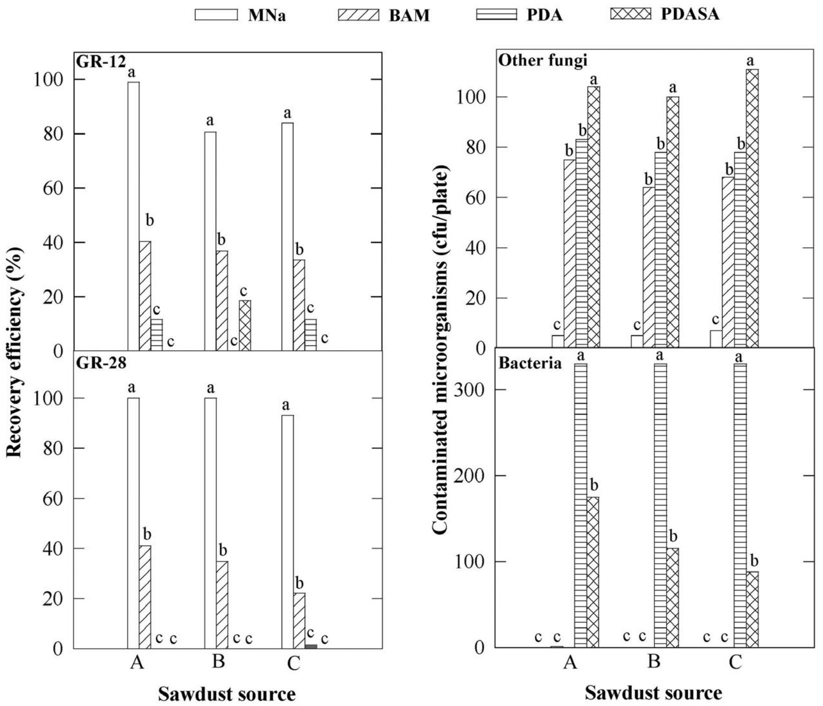
利用麥芽糖—亞硝酸鈉（MNa）半選擇性培養基，檢測農試所杏鮑菇栽培場與鄰近之栽培基質，發現在栽培原料中，每克山黃麻木屑可分離到本菌約0-1.0×10^2 cfu（colony-forming units），同時在菇場鄰近之樹下土壤中，可發現有0-3.0×10^2 cfu的杏鮑菇褐斑病菌存在。尤其在栽培場之空氣濾網上的塵埃，每克可檢測到1.3×10^4-2.9×10^4 cfu；進一步，逢機將上述樣品檢測到的5菌株，分別接種於杏鮑菇的菇體，測試它們有無病原性，結果證實



圖一、不同碳素源對杏鮑菇褐斑病菌GR-12與GR-28菌株之菌絲生長的影響。

Fig. 1. Effect of carbon sources on mycelial growth of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 on modified Czapek's medium plates using NaNO3 as a nitrogen source for 7 days at 28℃.

* Means (n=4) among different carbon sources for each isolate followed by the same letter are not significantly different (P =0.05) according to Duncan's multiple range test.



圖二、利用麥芽糖—亞硝酸鈉半選擇性培養基(MNa)添加鏈黴素50ppm、氯黴素50ppm、免賴得1ppm、丙酸鈉50ppm及1% (w/v)玫瑰紅之蔡氏培養基(BAM)、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)、添加鏈黴素50ppm和氯黴素50ppm的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDASA)偵測A、B、C等三種木屑中杏鮑菇褐斑病菌的回收效率與雜菌的出現率。

Fig. 2. Recovery of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 from A, B and C sawdusts infested with 10^4 spores/g dry sawdust of the pathogen on the Maltose-NaNO2 semiselective medium (MNa), Czpeak's medium+50 ppm streptomycin sulfate + 50 ppm chloramphenicol +1 ppm benomyl + 50 ppm sodium propionate + 1%(w/v) rose bengal (BAM), Potato dextrose agar (PDA), PDA + 50 ppm streptomycin sulfate + 50 ppm chloramphenicol (PDASA), respectively. Contaminated microorganisms were also counted on each plate of MNa, BAM, PDA and PDASA media.

表二、不同碳氮素源對杏鮑菇褐斑病菌GR-12 與GR-28 菌株菌絲生長的影響

Table 2. Effect of carbon and nitrogen sources on mycelial growth of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 for 7 days at 28℃

Nitrogen source[1]	Colony size (mm, dia.)							
	Sucrose		Starch		Sorbitol		Maltose	
	GR-12	GR-28	GR-12	GR-28	GR-12	GR-28	GR-12	GR-28
Ammonium chloride	34.2 g[2]	33.0 f	46.2 cd	45.0 e	43.8 de	47.0 cd	42.0 e	41.3 f
Ammonium nitrate	34.8 g	33.0 f	47.0cd	46.6 de	46.0 bc	46.8 cde	49.3 c	43.8 e
Ammonium phosphate	31.6 h	29.8 g	44.8 ef	45.4 e	43.0 ef	45.3 ef	46.5 d	41.5 f
Ammonium sulphate	39.4 f	40.6 e	41.8 g	41.8 f	45.8 bc	46.5 def	48.0 cd	46.0 cd
Asparagine	42.6 e	43.2 de	46.6 cd	45.6 e	45.3 cd	48.3 bc	49.5 c	46.5 bcd
Calcium nitrate	46.6 cd	47.2 ab	50.2 b	47.4 cd	47.0 b	49.0 b	51.8 b	45.8 cd
Casein	48.0 abc	47.2 ab	44.2 f	49.2 ab	41.0 g	42.8 g	52.0 b	43.0 e
Potassium nitrate	49.4 ab	49.0 a	52.0 a	49.8 ab	50.8 a	51.5 a	52.5 b	47.5 b
Sodium nitrate	49.6 a	46.6 abc	50.6 b	50.4 a	50.0 a	51.0 a	49.8 c	46.5 bcd
Sodium nitrite	47.8 bc	45.6 bcd	45.8 de	48.4 bc	50.5 a	51.0 a	54.5 a	50.5 a
Tyrosine	45.8 d	47.0 ab	43.6 f	47.2 cd	44.8 cd	48.8 b	49.5 c	45.3 d
Urea	43.2 e	43.8 cd	47.4 c	48.4 bc	41.75 fg	45.0 f	42.8 e	46.8 bc

[1] Each of nitrogen sources was added into Czapek's medium with sucrose, starch, sorbitol or maltose as a carbon source.
[2] Means (n=4) in the column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05) according to Duncan's multiple range test.

表三、不同濃度之化學藥劑對杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株菌絲生長之影響

Table 3. Effect of different pesticides with various concentrations on mycelial growth of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 for 7 days at 28℃

Pesticide[1]	Colony size (mm, dia.)		
	Conc. (ppm)	GR-12	GR-28
Benomyl	250	4.0 b	4.3 fgh
	500	3.8 b	3.5 h
Carbendazim	500	7.3 b	12.3 c
	1000	6.5 b	9.3 d
Daconil	1000	3.8 b	4.8 fgh
	2000	0.0 c	0.0 i
Flutolanil	200	48.8 a	45.8 a
	400	46.5 a	42.8 b
Iprodione	500	4.0 b	5.5 efg
	1000	4.0 b	4.0 gh
Mer.ect	1000	6.3 b	6.8 e
	2000	6.5 b	6.0 ef
Prochloraz-Mn	200	0.0 c	0.0 i
	400	0.0 c	0.0 i
None (CK)		49.0 a	43.8 b

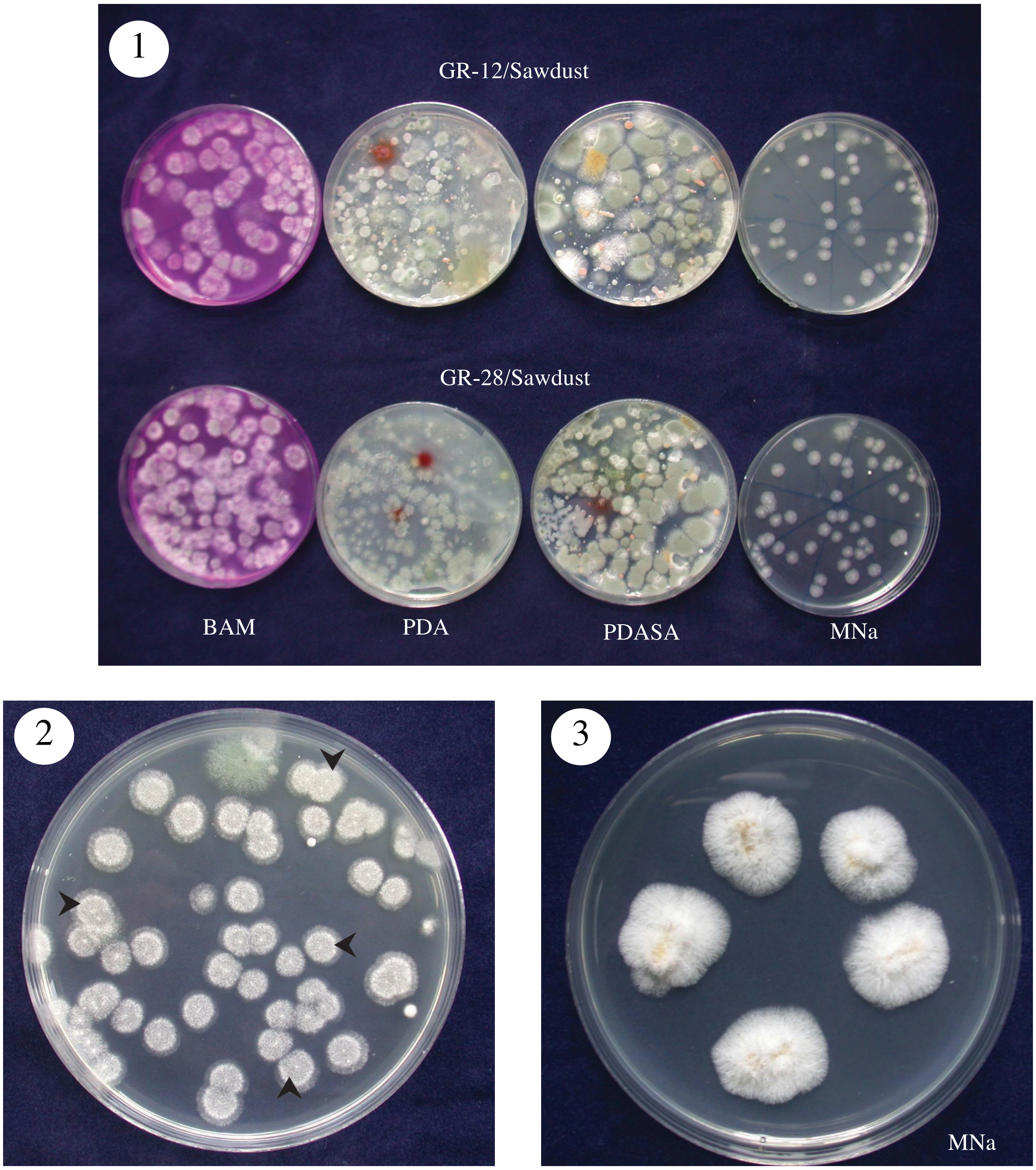
[1] Each pesticide was respectively added into basal medium (MNa medium consisted of 30 g Maltose, 2 g $NaNO_2$, 1g K_2HPO_4, 0.5 g $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g $FeSO_4$ $7H_2O$, 15 g agar, and 1L distilled water).
[2] Means (n=4) in the same column followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test.

表四、不同濃度之化學藥劑對杏鮑菇褐斑病菌 GR-12 與 GR-28 菌株菌絲生長之影響

Table 4. Effect of different pesticides with various concentrations on mycelial growth of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 for 24 hours at 28℃

Pesticide[1]	Hyphal length (μm)[2]		
	Conc. (ppm)	GR-12	GR-28
Benomyl	1	319.2 a[3]	320.4 a
	2	343.3 a	339.2 a
	3	340.8 a	332.9 a
	4	351.3 a	314.6 a
	5	138.3 b	142.5 b
Mertect	1	340.8 a	327.5 a
	2	360.4 a	345.0 a
	3	354.2 a	349.6 a
	4	342.5 a	319.2 a
	5	341.6 a	332.9 a
Prochloraz-Mn	1	45.0 c	43.5 c
	2	36.0 c	32.3 c
	3	29.0 c	25.8 c
	4	23.1 c	25.6 c
	5	13.1 c	15.6 c
None (CK)		348.3 a	329.2 a

[1] Each pesticide was respectively added into basal medium (MNa medium consisted of 30 g maltose, 2 g $NaNO_2$, 1g K_2HPO_4, 0.5 g $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g $FeSO_4$ $7H_2O$, 15 g agar, and 1L distilled water).
[2] Spore suspension (1.3×10^4 spores/ml) of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 was spread on MNa medium with or without pesticide. The hyphal length was measured after 24 hrs incubation at 28℃.
[3] Means (n=4) in the same column followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test.



圖三、(1)利用麥芽糖—亞硝酸鈉半選擇性培養基(MNa)、添加鏈黴素 50ppm、氯黴素 50ppm、免賴得 1ppm、丙酸鈉 50ppm及1%(w/v)玫瑰紅之蔡氏培養基(BAM)、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)、添加鏈黴素 50ppm和氯黴素50ppm的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDASA)偵測木屑中杏鮑菇褐斑病菌；(2)MNa半選擇性培養基偵測木屑中的杏鮑菇褐斑病菌；(3)利用MNa半選擇性培養基分離杏鮑菇褐斑病罹病組織上的病原菌。

Fig. 3. (1) Recovery of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 from the mixed sawdust infested with the pathogen on the Maltose-$NaNO_2$ semiselective medium (MNa), Czapek's medium+50 ppm streptomycin sulfate + 50 ppm chloramphenicol +1 ppm benomyl + 50 ppm sodium propionate + 1%(w/v) rose bengal (BAM), Potato dextrose agar (PDA), PDA + 50 ppm streptomycin sulfate + 50 ppm chloramphenicol (PDASA); (2) Recovery of *G. roseum* isolate GR-28 from sawdust infested with the pathogen on Maltose-$NaNO_2$ (MNa) semiselective medium;(3) Isolation of *G. roseum* from diseased fruit-bodies of *Pleurotus eryngii* on MNa semiselective medium.

表五、不同濃度鏈黴素、氯黴素及青黴素對杏鮑菇褐斑病菌GR-12與GR-28二菌株菌絲生長之影響

Table 5. Effect of streptomycin sulfate, chloramphenicol and penicillin G on mycelial growth of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 on the basal medium for 24 hrs at 28℃

Treatment	Hyphal length (μm)[2]		
	Conc. (ppm)[1]	GR-12	GR-28
Chloramphenicol	100	259.6	231.7
	200	257.5	238.8
	300	252.9	248.8
	400	269.6	251.3
	500	251.7	243.8
Penicillin G	100	261.3	239.2
	200	265.8	251.7
	300	268.8	248.3
	400	271.3	250.8
	500	271.7	270.8
Streptomycin sulfate	100	278.8	257.1
	200	269.2	252.5
	300	286.7	260.4
	400	271.3	250.0
	500	281.3	240.8
None (CK)		263.3	252.9
$LSD^3_{0.05}$		45.2	40.8

[1] Each of chemicals was respectively added into basal medium (MNa medium consisted of 30 g maltose, 2 g $NaNO_2$, 1g K_2HPO_4, 0.5 g $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g $FeSO_4$ $7H_2O$, 15 g agar, and 1L distilled water).

[2] Spore suspension (1.3×10^4 spores/ml) of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28 was spread on the MNa medium with or without antibiotic for 24 hours at 28℃ and hyphal length was measured. Four replicates were conducted and 25 germinated spores of each replicate were measured.

[3] Least significant difference at $P = 0.05$.

均具有病原性反應。至於在其他栽培資材上，並未測到本菌的存在（表五）。此外，MNa 半選擇性培養基尚可鑑別罹病菇體，有無遭受杏鮑菇褐斑病菌的感染（圖三）。

討 論

近年來，台灣中部地區栽培的杏鮑菇遭受 *G. roseum* 危害，致使菇體出現褐斑、畸形、龜裂及黃萎枯死的病徵，且失去商品價值[1]。為了釐訂本病害的防治對策，研製 *G. roseum* 的選擇性或半選擇性培養基，作為追蹤病原菌的存活處所與傳播途徑的工具，確是有效達成病害防治的最佳手段。

一般配製植物病原菌的選擇性培養基，需具有下列二項基本原則：即培養基的主要組成分要能促進病原菌的生長外，尚且可以展現選擇性抑制其他菌類生長的效果[16]。Domsch 氏等人[5]指出麥芽糖、葡萄糖與蔗糖及硝酸態氮有助於 *Gliocladium* spp. 的生長。本研究利用除去 Czapek's 配方中的碳源或氮源作為基礎培養基，逐一評估各碳、氮素源對杏鮑菇褐斑病菌生長的影響，結果發現麥芽糖搭配亞硝酸鈉，最具有促進本菌菌絲生長的功效。進一步，採用麥芽糖和亞硝酸鈉作為基礎培養基的碳氮素源，檢測不同化學藥劑對本菌生長的影響，結果發現200 ppm 福多寧，5 ppm 腐絕，500 ppm 鏈黴素，500 ppm 青黴素及 500 ppm 氯黴素等均不會抑制本菌生長，惟福多寧與腐絕尚可抑制其他多種真菌[15]。將上述有助於 *G. roseum* 生長的碳、氮素源與不會抑制本菌的化學藥劑及抗生素調配成 MNa（Maltose-$NaNO_2$）半選擇性培養基，證實可有效由栽培基質的木屑與菇舍空氣濾網，偵測到杏鮑菇褐斑病菌的存在（圖四）。比較 MNa、BAM、PDA 及 PDASA 等

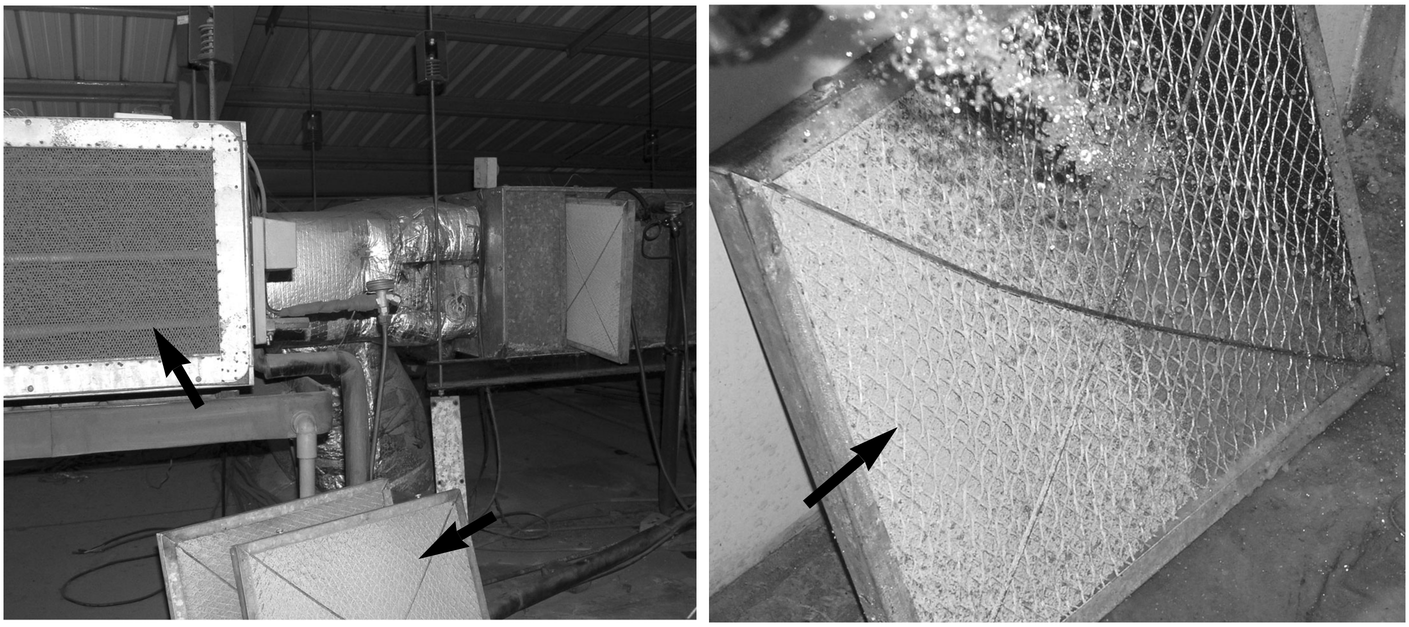
表六、以MNa半選擇性培養基偵測杏鮑菇栽培材料與菇舍周圍環境之杏鮑菇褐斑病菌

Table 6. Detection of *Gliocladium roseum*, the causal agent of brown spot disease of king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* from materials of *P. eryngii* cultivation and soils around mushroom house by MNa semiselective medium

Item	*G. roseum* [cfu/g soil (or mL water)×100]			
	Test I	Test II	Test III	Test IV
Materials for cultivation				
Mixed sawdust	0	0	0	0
Trema orientalis sawdust	0	0	1	0
Rice bran	0	0	0	0
Wheat bran	0	0	0	0
Water	0	0	0	0
Air filter	17	24	29	13
Soil around mushroom house				
Soil-A[1]	0	0	0	0
Soil-B	0	0	0	0
Soil-C	3	2	1	1
Peat moss[2]	0	0	0	0
Compost[2]	0	0	0	0

[1] Soil-A = field soil, soil-B = garden soil and soil-C = forest soil.

[2] Peat moss and compost were the substrates which were used for culturing Agaricus bisporus .



圖四、杏鮑菇栽培室循環空氣濾網上聚積大量杏鮑菇擔孢子與褐斑病菌之孢子。
Fig. 4. Basidiospores of Pleurotus eryngii and conidia of *Gliocladium roseum* were found in the air filter(arrowhead) of the mushroom cultivation room.

培養基偵測木屑中的 *G. roseum*，發現 MNa 培養基平板的檢測效能最佳，且其他雜菌的污染率最少（圖二），顯示 MNa 半選擇性培養基可作爲監測本菌的簡易工具。本菌在 MNa 培養基平板上，菌落呈放射狀，菌絲氣生，淡白色。雖然其他眞菌如 *Aspergillus* 屬的菌落可在 MNa 平板上出現，但仍可由菌落的形態、顏色及生長速度，極易與其他菌類區分開。

謝　辭

本文係第一作者碩士論文的一部份。研究期間承蒙行政院農業委員會農業試驗所植物病理組 張清安組長、陳金枝、陳美杏及林玫珠等小姐的鼎力相助，使研究順利完成，特誌謝意。

引用文獻

1. 陳錦桐. 黃振文. 2004. 杏鮑菇褐斑病菌之鑑定. 植病會刊 13：17-26.
2. 林秀儒. 黃振文. 2002. 蒿苣褐斑病菌之半選擇性培養基. 植病會刊 11:147-156.
3. Aube, C., and Gagnon, C. 1970. Influence of certain soil fungi on alfalfa. Can. J. Plant Sci. 50:159-162.
4. Carris, L. M., Glawe, D. A., Smyth, C. A., and Edwards, D. I. 1989. Fungi associated with populations of *Heterodera glycines* in two Illinois soybean fields. Mycologia 81:66-75.
5. Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. 1980. *Gliocladium* Corda 1840. Pages 368-377 *in*: Compendium of Soil Fungi. K. H. Domsch, and W. Gams, eds. Academic Press. London.
6. Gochenaur, S. E. 1975. Distributional patterns of mesophilus and and thermophilous microfungi in two bahamian soils. Mycopathologia 57:155-164.
7. Huber, D. M., and Finley, A. M. 1959. *Gliocladium*, a causal agent in the bean root rot complex in Idaho. Plant Dis. Reptr. 43:626-628.
8. Kilpatrick, R. A., Hanson, E. W., and Dickson, J. G. 1954. Relative pathogenicity of fungi associated with root rots of red clover in Wisconsin. Phytopathology 44:292-297
9. Krzemieniewska, H., and Badura, L. 1954. Some observations on the mycoflora of beech woods. Acta Soc. Bot. Pol. 23:545-587.
10. Marin, D. H., Sutton, T. B., Blankenship, S. M., and Swallow, W. H. 1996. Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. Plant Dis. 80:525-528.
11. Park, Y. H., Stack, J. P., and Kenerley, C. M. 1992. Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. Plant Dis. 76:230-235.
12. Rogerson, C. T., and Stephenson, S. L. 1993. Myxomyceticolous fungi. Mycologia 85:456-469.
13. Siddaramaiah, A. J., Kulkarni, S., Haralappa, H. S., and Hegde, R. K. 1981. A new fruit rot disease of *Anona squamosa* L. from India. Current Sci. 50:1001-1002.

14. Theron, D. J., and Holz, G. 1991. Dry rot of potatoes caused by *Gliocladium roseum*. Plant Pathol. 40:302-305.

15. Thomson, W. T. 1991. Agricultural Chemicals Book IV. Thomson Press, America. 198pp.

16. Tsao. P. H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 8:157-186.

ABSTRACT

Chen, J. T.[1], and Huang, J. W.[2,3] 2004. A Semiselective Medium for Detecting *Gliocladium roseum*, the Causal Agent of King Oyster Mushroom Brown Spot. Plant Pathol. Bull. 13:107-116. ([1].Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, COA, Wufeng, Taichung, Taiwan; [2].Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan. [3].Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw, Fax: +886-4-22851676)

Twelve carbohydrates and twelve nitrogenous compounds were evaluated for their effects on mycelial growth of *Gliocladium roseum* isolates GR-12 and GR-28, the causal agent of brown spot of king oyster mushroom（*Pleurotus eryngii*）. Among those carbon-source compounds, sucrose, sorbitol, starch and maltose were more effective than other carbohydrates to enhance the growth of *G. roseum*. For nitrogenous compounds, $NaNO_3$, $NaNO_2$ and KNO_3 were more effective to enhance growth of the pathogen. Seven pesticides were separately added into the basal medium (a modified Czapek's medium containing 3% (w/v) maltose and 0.2% (w/v) $NaNO_2$, MNa medium) to investigate their suppressive effectiveness for mycelial growth. Data showed that mycelial growth of the pathogen was not inhibited by flutolanil at 200 ppm, mertect at 4 ppm, streptomycin sulfate at 500 ppm, chloramphenicol at 500 ppm and penicillin G at 500 ppm. Therefore, maltose-$NaNO_2$ semiselective medium (MNa semiselective medium) consisting of 30 g maltose, 2 g $NaNO_2$, 1 g K_2HPO_4, 0.5 g $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.01 g $FeSO_4$ $7H_2O$, 20 g agar, 200 ppm flutolanil, 4 ppm mertect, 200 ppm streptomycin sulfate, 200 ppm chloramphenicol, 200 ppm penicillin G and 1L distilled water was formulated for the enumeration and isolation of *G. roseum* from infested sawdust. The results showed that *G. roseum* could be accurately detected from artificially and naturally infested sawdust by use of MNa semiselective medium. Population density of the pathogen in naturally infested sawdust and soil was 0-1.0$\times10^2$cfu/g sawdust and 0-3.0$\times10^2$cfu/g soil, respectively. High population density of the fungus was also detected from air filter of the mushroom cultivation room by MNa semiselective medium.

Key words : *Pleurotus eryngii*, *Gliocladium roseum*, maltose-$NaNO_2$ (MNa) semiselective medium